

3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene および Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate 投与ラット肝に増生する "Oval Cell" の組織化学的および電顕的組織化学的研究

水無瀬 昂 小川 勝 洋 横山 繁 昭

札幌医科大学病理学第2講座 (指導 小野江為則)

Histochemical and Electron Microscopic Cytochemical Studies of "Oval Cells" Induced by 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene and Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate in Rat Liver

Takashi MINASE, Katsuhiko OGAWA
and Shigeaki YOKOYAMA

Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Onoé)

The present report is concerned with the origin and the fate of the oval cells induced by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (DAB) and alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT) in rat liver.

The following results were obtained:

(1) Within one or two weeks, oval cells appeared in the periportal areas in both DAB and ANIT fed rats. Tubules were formed which were connected with cholangioles and proliferated along the space of Disse between hepatocytes and sinusoidal lining cells. Their ultrastructural characters were similar to those of cholangiolar cells and did not show any remarkable glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) activity.

(2) In the 4th week, oval cells increased in number in both groups of rats, but oval cells induced by DAB and those by ANIT were quite different. In DAB fed rats, some diversities in morphology of oval cells appeared, some of which showed round nuclei and relatively ample cytoplasm, with an appearance of small hepatocytes. Ultrastructurally, some oval cells were similar to cholangiolar cells while others showed various cytostructural characteristics between cholangiolar cells and hepatocytes. A variation in intensity of G-6-Pase activity, almost proportional to their degree of morphological resemblance to hepatocytes was seen. On the other hand, oval cells induced by ANIT formed relatively large tubules associated with various amounts of connective tissue. Ultrastructurally, these were similar to cholangiolar cells and showed negative or weak G-6-Pase activity of the same degree as seen in normal cholangiolar cells.

(3) In the 6th week, in DAB fed rats, small hepatocytes showed an increase which had a marked G-6-Pase activity, corresponding to the decrease of oval cells with cholangiolar features. In ANIT fed rats, some oval cells formed larger tubules with increasingly abundant connective tissue compared with those in the 4th week. However, there was no evidence of transition from oval cells to hepatocytes as seen in DAB fed rats.

結 言

ある種の肝癌原物質を投与したラット肝ではしばしばい
わゆる "oval cell" が肝小葉周辺帯より増生してくる^{1~4)}。
この細胞は光顕的に、核が卵円形で核・細胞質比の大きい
細胞であり、その由来に関しては小胆管上皮細胞^{1~5,13,14)}、

線維芽細胞^{1,15,16)}、内皮細胞^{18,19)}、肝細胞^{13,15)} など諸説が
あった。

電顕的にはこの細胞が小胆管上皮細胞由来とする説^{6~12)}
が強いが、肝細胞由来⁴⁶⁾とするものもあり、未だ議論が
ある。

3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (DAB) 投与

ラット肝においては飼養を続けることによりこの細胞はむしろ減少し、替ってこの部位に小型の肝細胞が出現してくる⁶⁾。この DAB 投与による大幅な細胞集団の変動に関して大別すると次の二説がある。

1) oval cell が変性脱落し、かわって肝細胞が増生する^{9,11-13)}。

2) oval cell が成熟分化し、肝細胞へと形をかえる^{1,2,4,5,14)}。

教室の稲岡⁷⁾はこの時期を電顕、組織化学及びオートラジオグラフィを用いて検討し、この細胞が肝細胞へ移行しうると報告した。

本研究は oval cell を電顕的に再検討し、さらに肝細胞の marker enzyme とされる glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) 活性を調べ、oval cell が肝細胞への移行的性質を持つか否かを検討した。

一方 oval cell あるいは oval cell 様の細胞は種々の薬剤投与によって増生してくることが知られている。その一つである alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT) によっても高度の oval cell 様の細胞の増生が起こる。今回これらの細胞についても同様に肝細胞へ移行しうるか否かを検討した。

実験材料および方法

動物は Wistar 系雄ラット (実験開始時体重: 200-250 g) を用い、これを標準飼料 (オリエンタル酵母社) と水を自由に与え飼養した。

1) 正常群: 無処置ラット 14 匹を正常対照群として用いた。

2) DAB 投与群: DAB を 0.06% の割合で標準飼料に混じ投与した⁶⁾。ラットは 1, 2, 3, 4, 6, 8 週間 (各 2 匹) 上記飼料で飼育した後、実験に使用した。

3) ANIT 投与群: Lopez²³⁾らの方法に準じ ANIT 1 g を少量のオリーブ油に溶かし、これを 1 kg の標準飼料に混じ投与した。ラットは 1, 2, 3, 4, 6, 8 週間 (各 2 匹) 上記飼料で飼養後実験に使用した。

実験動物は屠殺前 12 時間飢餓状態にし、午前 10 時から 11 時の間に屠殺した。

灌流固定法は Wisse²⁴⁾の方法に準じ、エーテル麻酔下で開腹し、肝門脈に 19 G の注射針を刺し、これより 1.25% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) を 90 cmH₂O の圧で流し肝を固定した。固定液の灌流は 1 分以内に中止し、直ちに緩衝液 (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) に切りかえ、固定液を洗い流した。固定した肝は緩衝液中 (0.1 M cacodylate buffer, 7% sucrose, pH 7.4, 4°C) に移し一部は光顕用に 5% buffered formalin (pH

7.4) で再固定し、パラフィン包埋後 HE 染色、PTAH 染色を行い検鏡した。また一部は氷結切片を作製し、HE 染色、G-6-Pase に対する組織化学的検索を行なった。G-6-Pase の活性の保持を比較する目的で固定液は種々の濃度のものを使用した。

電顕的には肝を Oxford Vibratome で約 20 μ の厚さに薄切し、光顕的に G-6-Pase 活性を観察した後、目的の場所を次の約 40 μ の切片から切り抜き、組織化学的検索に用いた。

G-6-Pase 活性の組織化学的検索は Wachstein および Meisel の方法に従い²⁰⁻²²⁾、切片を 0.125% glucose-6-phosphate-Na (Sigma 社) (Tris malate buffer, pH 6.75) 溶液中で 30 分間 incubation した。光顕的にはこれを蒸留水で洗浄後希硫酸アンモニウムで発色させ、検鏡した。電顕用には蒸留水洗浄後、2% OsO₄ (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, 4°C) で 30 分間後固定し、以下型の如くアルコール脱水、Epon 812 包埋を行い、LKBI 型ミクロトームで超薄切片を作製し、一部 Raynold 鉛溶液で単染色し、また一部は酢酸ウラニル 70% アルコール飽和溶液と鉛溶液との二重染色を行い、JEM 100 C で直接倍率 90 倍から 5,000 倍で観察した。

なお、G-6-Pase の生化学的検索は Swanson²⁵⁾の方法によった。

実験結果

1. 灌流固定法による G-6-Pase 活用の保持について

浸漬固定したものでは類洞がつぶれ、見にくくなっているが、灌流固定したものでは、類洞がよく保持されている。光顕的に固定液の濃度差による G-6-Pase 活性の差を比較すると、5%、1 分間の灌流固定ではほとんど活性を認めず、2.5% では未固定のものよりやや低下していた。しかし 1.25%、0.625% では未固定のものほとんど活性の強さに差がなかった。活性の強さは小葉周辺帯がいくぶん強く、中心帯ではやや弱かった (第 1 図)。活性は肝細胞の細胞質に限られ、沿岸細胞、小胆管上皮細胞、血管結合織および浸潤血液細胞は陰性であった (第 2 図)。

電顕的には光顕所見に一致して強い活性を肝細胞に認めた。活性を示す細胞は小葉内で大差なく、ほとんど総ての肝細胞に認めた (第 4 図)。その細胞内分布は核膜周囲腔 (以下 PNC)、粗面小胞体 (RER) および滑面小胞体 (SER) が陽性であり、Golgi 装置は通常陰性、核、リソゾームおよび細胞質基質も陰性であった (第 3 図)。

肝細胞以外の肝構成成分では沿岸細胞 (類洞内皮細胞、Kupffer 細胞)、脂肪摂取細胞、小胆管上皮細胞、門脈血管内皮細胞のいずれも多くは陰性であった。しかし時に小胆

管上皮細胞 (第5図), Kupffer 細胞, 浸潤血液細胞に極く弱い陽性所見を認めた。またまれではあったが類洞内皮細胞にも微弱陽性所見を認めた。その細胞内の局在は肝細胞と同様であり, PNC, RER, SER であった。また時には毛細胆管および Disse 腔に面した肝細胞の微絨毛にも陽性所見を認めた。

この活性は5% glutaraldehyde で固定したものではほとんど認めず, 2.5% ではいくぶん活性が弱かった。1.25%, 0.625% では強い活性を認めたが, しかし0.625% では核の濃縮や糸粒体の膨化, ER の拡張など artifact の所見がみられた。

生化学的検索では未固定のものを100%とすると, 0.625%, 1.25% のものはそれぞれ73.2%, 68.3%と強い活性を認めたが, 2.5%, 5.0% では39.0%, 24.4%と活性低下が著しかった。

以上の結果より以下の実験は総て1.25% glutaraldehyde の灌流固定を行った。

2. 実験群光顕所見

a) DAB 投与ラット肝: 投与1週目より小葉周辺帯に核が長楕円形ないし卵円形で, 核・細胞質比 (以下 N/C) の大きい oval cell の増生をみた。これは2週目でより顕著であった (第6図)。既存の肝細胞は好酸性を示すものが多くなり, 中心帯の近くには大型の肝細胞が目立った。

4週目では中間帯より中心帯にまで oval cell の増生をみる小葉もあった (第7図)。またこの増生細胞集団の中には小型であるが, 核が円形で N/C のやや大きい肝細胞に類似の細胞も散見できた。

しかし6週目では oval cell の増生が減じ, 小葉周辺帯に限定される傾向があった (第8図)。Oval cell の増生していた部位には小型の肝細胞によく似た細胞が増生していた。これは8週目ではより顕著であった。

PTAH 染色では4週目の oval cell 集団の中に弱陽性を示す小型の肝細胞に類似の細胞がみられた (第9図)。

G-6-Pase 活性は DAB 投与初期には oval cell の増生部位に一致して低かった。これは4週目で, より著明であった (第10図)。しかしこの部位にも明らかに陽性と認められる細胞が混在していた。この陽性細胞は他の細胞に比較して核がやや円形で細胞質も比較的豊富であったが, この細胞の正確な同定は光顕レベルでは困難であった。

6週目では周辺帯に, 小型の細胞で陽性のものが観察された (第11図)。

b) ANIT 投与ラット肝: 投与1週目ではグリソン鞘はやや浮腫状であり, 好中球などの細胞浸潤に加え, DAB でみた oval cell と類似の細胞の増生をみた。

2週目では浮腫および細胞浸潤は軽減したが, oval cell

の増生はより顕著であった (第12図)。この細胞の多くはグリソン鞘の小胆管上皮との連続性を示した。

4週目の増生細胞は oval cell というよりはむしろ拡張した腺腔形成をみる小胆管上皮細胞の性格が明らかなものが多かった (第13図)。

これ以降8週まで観察したが4週目と同様に oval cell の増生は目だたず小胆管上皮細胞と考えられるものが多かった。一部ではこの細胞の周囲に結合織の増生が著明であった (第14図)。

DAB 4週目以降に観察された小型の肝細胞様の細胞の出現は認めなかった。また, 個々の肝細胞の変化も著明でなかったが, 時に巣状の壊死を認めた。

PTAH 染色では, 増生細胞は各時期とも常に陰性であった (第15図)。

G-6-Pase 活性も肝細胞にのみ認め, 増生してきた細胞には活性を認めなかった (第16, 17)。同時にグリソン鞘内に孤立性に陽性細胞をみたが, これらの多くは既存の肝細胞と考えられた。

3. 電顕所見

1) DAB 投与群

a) DAB 投与1週目および2週目: 肝小葉周辺帯には光顕像に一致して oval cell の増生をみた (第18図)。この細胞の超微形態の特徴は核が長楕円形ないし卵円形で N/C が大きく, 核小体が一般に明瞭であり, chromatin が核膜周辺に密在する傾向があった。

細胞質には遊離リボソームが豊富で, 細線維を認めるものが多いが, RER の発達は悪く, SER は明瞭でない。糸粒体は小型であり, その数も少なく, 肝細胞のそれに比し淡明であった。Golgi 装置, リソソームは少なく, マイクロボディは認めなかった。管腔側には微絨毛をもち, 時に纖毛を認める細胞もあった。基底側は基底膜で囲まれており, 細胞間にはデスモソーム結合を認めた。またこの細胞はしばしばグリソン鞘の小胆管上皮細胞と連続している像が観察され, 時に核分裂像をみた。

肝細胞とは多くの場合, 線維芽細胞, 膠原線維, 浸潤血液細胞により隔てられているが, 直接肝細胞と接し, これと共通の管腔をつくっているものもしばしば観察された (第19図)。この際 oval cell を取り囲んでいる基底膜は肝細胞との接触部で突然消失していた。

oval cell はしばしば肝細胞と肝細胞の間, あるいは肝細胞と沿岸細胞の間 (Disse 腔) に割り込むように小葉内に侵入し, 類洞内にこの細胞をみることはなかつた。

以上の oval cell の超微形態の特徴は, 正常肝における小胆管上皮細胞 (cholangiolar cell) と極めて類似している。

肝細胞の変化としては RER の層状配列が乱れ、蛇行しており、SER は小空胞状、管状のものが密に細胞周辺部に集まっているものが多かった。他の小器官の変化は一般に軽微であったが、時に核の濃縮化、糸粒体の大型化、淡明化、リボゾームの減少、リソソームの増加など、変性を思わせる所見を示す細胞が散見された。

この時期の G-6-Pase 活性は肝細胞に強い活性を認めたが、増生している oval cell では多く陰性であり、一部に極く弱い活性を示す細胞を認めた。しかしその強さは正常にもときにみられる微弱陽性小胆管上皮細胞のそれと同程度であり、低倍率ではその活性の存在を確認できなかった。

b) DAB 投与 4 週目: oval cell は小葉周辺帯に限らず中間帯にも認めた。これは 2 週目と同様に、肝細胞と肝細胞の間あるいは Disse 腔に増生しており、超微形態的特徴は 2 週目と異なり多彩であった (第 20 図)。

即ち (1) 小胆管上皮細胞に類似のもの、(2) 小胆管上皮細胞と肝細胞の両方の特徴をもつもの、(3) 肝細胞に類似のもの、に大別できた。以下に 3 群の細胞の概略を述べる。

(1) 小胆管上皮に類似の oval cell: 2 週目に増生してきた oval cell と同様である (第 21 図)。

(2) 肝細胞と小胆管上皮細胞の両方の特徴をもつ oval cell (第 22 図): 前者よりやや大型の細胞で、核は卵円形のものが多く、時に陥凹を認め、前者より核周辺部への chromatin の凝集は少なく、N/C は小さいものが多い。遊離リボゾームは豊富である。RER の発達がやや良好となり、SER は未だ明瞭でないものが多いが僅かに認めるものもあった。糸粒体は大型のもの、小型のもの種々であり、数はやや増しており、基質の濃度も大型のものでは増していた。大小の脂肪滴を含むものもあり、Golgi 装置はやや発達している。リソソームは少なく、マイクロボディは多くの場合認めなかった。管腔側には微絨毛をもち、ときに纖毛も認めた。基底側は基底膜で取り囲まれているがこれを欠くこともあった。

(3) 肝細胞に類似の oval cell: 正常の肝細胞より小型であるが、(1)、(2) の細胞よりやや大型である。核はほぼ円形であり、陥凹をみるものは少なかった。核周辺部への chromatin の凝集は軽度で、N/C は前二者より小さい。遊離リボゾームは減少し、RER の発達が目立った。SER も明瞭なものが多い。糸粒体の大きさ、数、基質の濃度は肝細胞のものに近いが、ときに少数の、小型で淡明な基質の糸粒体をもつ細胞も認めた。大小の脂肪滴を保持するものが多いが、細線維はほとんど認めない。マイクロボディを持つものと、これを欠くものがある。管腔側には微絨毛をもち、基底膜は多くの場合欠いているが、これを持つものもあった。ときに (1)、(2)、(3) の細胞が、共通の

管腔をつくっていることがあった (第 24 図)。

以上の如く、DAB 4 週目に oval cell として光顕的に観察してきた細胞の中には電顕的に小胆管上皮細胞と肝細胞のどちらとも判定し難い細胞が多数あり、これらが不規則に入り乱れ認められた。一方小葉中心帯には大型の肝細胞が多く観察され、核も大型で淡明であり、N/C は小さく、SER の増加が目立つ。これは 2 週目と同様に小管状ないし、小空胞状であり、細胞周辺部に密在しており、このため細胞質は明るくみえた。

この時期の oval cell の G-6-Pase 活性もその超微形態に対応して多様であった。

上記 (1) に分類した細胞の多くのものは陰性であり、ときに極く弱い活性を示す細胞があった。(2) に分類した細胞では強陽性のもの、極く弱い活性しか示さないものと多様であった。その細胞内分布はいずれも PNC, RER, SER であった。しかし ER の発達程度、糸粒体の形態・数など形態が肝細胞に類似するほど、即ち、(1)→(2)→(3) となるほどその活性は強くなる傾向があった。

c) DAB 投与 6 週目: oval cell は小葉周辺帯に限定されることが多かった。替ってこの部位には小型の肝細胞を認めた (第 25 図)。即ち前期 (3) に分類した細胞よりも RER, SER がよく発達しており、マイクロボディを認めた。糸粒体は多く正常肝細胞のものに類似するが、小型のものも認めた。基底膜は多くの場合欠けていた。小葉周辺帯に認めた oval cell は前記 (1) に分類した細胞が多く (2)、(3) に分類した細胞は数が少なかった。

G-6-Pase 活性は小型の肝細胞では強陽性であるが、oval cell では 4 週目と同様、その超微形態に従い多様であった。

d) DAB 投与 8 週目: oval cell は小葉周辺帯に限定されることが多く、小型の肝細胞が小葉の大半を占めていた。類洞は明らかとなり、肝細胞索は多列性から一列性配列を示す傾向があった。小葉周辺帯にみる oval cell は小胆管上皮細胞に超微形態の類似するものが多く、核は細長く、細胞質に乏しく、扁平な細胞が多かった。この細胞は形態学的に変性所見は著明でなかったが、ときに管腔内への脱落を思わせる細胞があった。

G-6-Pase 活性は小型の肝細胞の増生部では陽性であり小葉周辺帯にみる oval cell では陰性か、微弱陽性であった。

2) ANIT 投与詳: 投与 1 週目より 8 週目まで検索したが、細胞同定が光顕的に比較的困難な 2 週目に重点をおいた。

a) ANIT 投与 1 ないし 2 週目: 光顕的に oval cell としてみた細胞はグリソン鞘の小胆管上皮細胞と多く連続

像を認め、形態も小胆管上皮細胞と類似していた(第26図)。即ち核は卵円形で、不規則な陥凹を示し、核膜周辺には chromatin が凝集しており、N/C が大きかった。遊離リボゾームは豊富で細線維を持つが、RER の発達は悪く、SER も明瞭でなく、ミクロボディは認めなかった。Golgi 装置の発達は悪く、リソソームも少ない。糸粒体は小型、少数であり、基質も淡明であった。短い微絨毛、ときには纖毛を管腔側に認め、外周は基底膜により囲まれていた。

この細胞は肝細胞とは線維芽細胞、膠原線維などにより隔てられていることが多いが肝細胞と共通の管腔を形成しているものも多かった(第27図)。この細胞を取り囲んでいる基底膜は肝細胞との接触部で消失していた(第28図)。

小葉内に出現するものでは oval cell と同様に肝細胞と肝細胞の間、あるいは Disse 腔を伝わるように侵入しており、類洞内には認めなかった。これらの細胞は一樣に小胆管上皮細胞に類似しており、DAB 投与ラット肝4週目に似た様な肝細胞と小胆管上皮細胞の両方の特徴をもつ細胞は認めなかった。

G-6-Pase 活性は肝細胞においてはよく保持されておりその局在は正常肝細胞と同様であった。Oval cell の多くは陰性ないし微弱陽性であり、DAB 投与4週目の oval cell に認めたような強い活性を示す細胞は認めず、その程度は正常の小胆管上皮細胞と同程度か、やや強い程度であった。

b) ANIT 投与4週目：光顕所見と同様に、明らかな腺腔を形成する小胆管上皮細胞の増生がグリソン鞘に認められ、肝細胞との移行を思わせる細胞は認めなかった(第29図)。

また各時期を通しての肝細胞の変化としては、リソソームがやや増加している程度であり、ER、糸粒体、ミクロボディ、Golgi 装置の変化は著明でなかった。しかし毛細胆管は著しい拡張を示し、変形していた。これを取り囲む無構造帯もやや肥厚していた。

c) ANIT 投与6週目：4週目よりも腺腔拡張は著明であり、肝細胞と共通の管腔をつくる細胞もいくぶん減少しており、多くの場合結合織で隔てられていた。

考 案

1. 灌流固定法による G-6-Pase 活性の保持に関して

肝組織の固定は通常浸漬固定がなされてきた。しかしこの方法には次のような大きな欠点がある。1) 類洞を充たしている血液が屠殺時に流出してしまうため類洞が押し潰され類洞構造が著しく損われる。2) 固定液が組織内に浸透するのに時間がかかり、組織の表面と中心部では固定

状態が異なる。

これに対し灌流固定法では類洞構造がよく保持され、肝全体を短時間で固定できる²⁴⁾。このように固定時間が短時間で済むため、これまで固定により簡単に酵素活性が失活し^{26,27)}電顕的に検索が困難とされてきた G-6-Pase のような細胞酵素の検索が可能となった。このことは Ericsson²¹⁾ が最初に指摘し、Leskes²²⁾ らも同様に灌流固定法により胎仔および新生仔ラットの小胞体における G-6-Pase の分化を観察している。

著者²⁸⁾ らも、低濃度の glutaraldehyde で短時間灌流固定することにより、酵素活性をよく保持したまま、超微構造を損わずに、肝組織全体をほぼ均等に固定できた。また約 20 μ の切片で光顕的に病変部位を確認し、電顕用に次の切片を選ぶことにより肝組織内の任意の病変部位を検索できた。

肝組織の G-6-Pase 活性に関してはこれまで多くの報告があり^{20~22,26~28)}、肝細胞の PNC, RER, SER に強い活性を認めるとするものが多い。著者らも正常肝においては肝細胞の PNC, RER, SER に強い活性を認めたが、時に極く弱い G-6-Pase 活性を小胆管上皮細胞、少数の Kupffer 細胞、好中球に認めた。Wisse³⁰⁾ も最近 Kupffer 細胞にこの活性を認めたとしており、Rosen³¹⁾ らは幼若血液細胞に活性を認めたと報告している。肝細胞以外で示す G-6-Pase 活性は、(1) これらの細胞が真に G-6-Pase をもっている、(2) G-6-Pase 以外の phosphatase が非特異的に無機リンを基質から遊離させる、(3) 最終反応生成物のために使用した鉛が非特異的に基質から無機リンを遊離させるという三つの可能性がある。Leskes らの検討の結果からみると(3)の可能性は少ないと考えられるが、前二者に関してはどちらとも著者らの実験では確認できなかった。

しかし肝細胞以外で示した G-6-Pase 活性が上記の可能性のいずれにもとずくものとしても、著者らがこの酵素を肝細胞の marker enzyme とすることには実際的には大きな問題とならなかった。即ち肝細胞以外の細胞には光顕的に活性を確認できないばかりでなく、電顕的にも弱拡大ではその存在が確認できない程度の微弱陽性であった。一方 oval cell の肝細胞への移行の有無の検討に際して問題にしたのは弱拡大でも十分に確認できる程度の陽性所見についてであった。従ってこのような条件では G-6-Pase 活性を肝細胞の marker enzyme と考えた著者らの考えは妥当なものと考えられる。即ち G-6-Pase が肝細胞にのみ陽性かどうかは検討の余地が残されているが、活性の強さを考慮に入れて検討すれば、肝細胞の marker enzyme として十分に役立つものと考えられる。

2) Oval cell に関して

緒言にも述べたが、DAB 肝癌の発生過程の初期に oval cell が増生することは古くから知られていた。Farber²⁾ は DAB と同様に 2-acetyl-aminofluorene, ethionine でも同様にその初期に oval cell が増生することから、この細胞の出現は肝癌発生過程に共通のものであると考えた。またこの細胞の組織由来については、1) 投与初期に小胆管上皮細胞に核分裂像を認め、2) この細胞は小葉周辺帯より増生を開始し、3) 管腔を形成する、という点から小胆管上皮由来である可能性を指摘した。しかしながら光顕的に線維芽細胞、内皮細胞との鑑別が容易でないことから、oval cell という曖昧な名称を使用した。光学顕微鏡の時代はこのため小胆管上皮細胞、線維芽細胞、内皮細胞、肝細胞とその由来について説が分れた。

電子顕微鏡の導入により、Grisham⁹⁾ ら、Schaffner³²⁾ らはこの細胞の形態学的特徴が小胆管上皮に類似することを報告した。著者らの教室でも^{6-8,33)} 同様の報告をしている。また著者らの今回の実験でも Farber の観察に加え G-6-Pase 活性が陰性かあるいは正常小胆管上皮と同程度の弱い活性しか認めないことから、この細胞の由来はグリッソンの小胆管上皮細胞と考えた。

Oval cell は初期には比較的均一な細胞であるが、時期が進むと(4週目頃)、多彩な超微形態を示す細胞集団と変化する。即ち光顕的に oval cell として観察していた集団の中には、電顕的に核の形態、N/C、細胞質の遊離リボゾームの豊富さ、細線維の有無、RER、SER の発達の程度、糸粒体の大きさ、その数、基質の濃度、脂肪滴の有無、マイクロボディ、纖毛および基底膜の存在の有無から、(1) 小胆管上皮に類似の細胞、(2) 小胆管上皮と肝細胞の両方の特徴をもつ細胞、(3) 肝細胞に類似の細胞の3群に大別できた。しかしながらこれらの相互の区別は必ずしも容易でなく、むしろ小胆管上皮細胞より肝細胞へと連続的な移行が想定された。さらに上述のように、肝細胞の marker enzyme と考えられる G-6-Pase 活性でも、形態が肝細胞に類似するほどその活性が強いことが明らかとなりこの点からも上記の移行が示唆された。

稲岡⁷⁾ は光顕的にオートラジオグラフィによる検索から oval cell から肝細胞への移行を推定しているが、著者らの所見でも小胆管上皮様の oval cell の減少と反比例して、小型の肝細胞が増生することをみており、しかもこの間に oval cell の変性壊死像はほとんど認めなかったため、細胞 population の動態の上からも移行の方向が小胆管上皮細胞様の細胞から小型の肝細胞へと向っていると考えざるを得ない。

従ってこの意味では4週目に出現する oval cell の大部

分(特に肝細胞と小胆管上皮細胞の両者にの特徴をもつ細胞)は、稲岡、岩崎が指摘した様に移行型細胞と呼ばれるべき性格をもった細胞と考えられる。

oval cell の増生の意義に関して稲岡は、肝細胞が強い有毒物質により障害された場合、肝組織の再生は既存の肝細胞によって行なわれず、かわりに芽細胞である oval cell がその再生の役割りを持つとした。小野江⁸⁾ もこの細胞は ER が乏しく薬物代謝酵素活性が未発達なために、DAB からの中毒代謝産物がつくられずに、これによる影響を受けずに増生できるのではないかと推定している。しかし Stein¹⁵⁾ らによれば、ethionine 発癌実験においては、同時に cortisone を投与することにより、肝細胞の ethionine による障害は cortisone 非投与時と同様に起こるが、oval cell の増生は抑えられると述べている。このことは肝細胞が強く障害される他に、間葉系細胞の関与もこの細胞の増生に重要な役割りを果たしていることを示唆しているものと考えられる。

ところで oval cell の増生とその肝細胞への分化に関連して興味ある事実、oval cell の増生期に一致する DAB 投与初期4ないし5週目をピークに一過性に胎児性蛋白である α -fetoprotein (AFP)³⁴⁾ が出現する点にある。AFP は正常ラット肝では胎生期に出現するが、成熟ラット肝においてはもはや証明されない。

このような、この時期の細胞の胎仔期に類似の性格は、エステラーゼなどの種々のアイソザイム³⁵⁻³⁷⁾ でも認められている。このような胎仔肝の性格は芽細胞の性質をもつ oval cell が肝細胞へと分化する過程で出現するものと推定される。

事実 Uriel⁴⁰⁾ らは AFP と estrogen の親和性の高い点に着目し、オートラジオグラフィでこの時期を検索し、oval cell に AFP を証明し、また教室の伝法^{41,42)} らも免疫蛍光抗体法により oval cell 集団の中に AFP を保持する細胞を証明した。

3. ANIT 投与ラット肝

ANIT 投与肝においても DAB 投与肝と同様に oval cell と類似の細胞が出現することはよく知られている²³⁾。この細胞の超微形態に関しては Steiner ら⁴³⁻⁴⁹⁾ の詳細な報告があるが、G-6-Pase を肝細胞の marker として、これを検索した報告はなく、また DAB との比較の意味で著者も検索した。

Steiner らは、増生してくる細胞の大部分は、小管腔をつくり、管腔側には微絨毛をもち、基底側には基底膜をもつ小胆管上皮に類似の細胞であり、線維芽細胞、内皮細胞とは異なることを明らかにした。

しかしこの細胞の中には ER の豊富さ、糸粒体の大きさ

数および遊離リボソームの豊富さにより二種の細胞があるとしている。このことから彼らは Leduc⁵⁾が指摘したように、肝細胞から小胆管上皮細胞への移行あるいはその逆の移行もあるのではないかと推定している。しかし著者の条件下では、このような二種類の細胞は観察できなかった。

初期に小胆管上皮細胞に核分裂像を認めること、および G-6-Pase 活性の電顕的な所見でも増生細胞は陰性かあるいは、微弱陽性であり、その強さは正常肝での小胆管上皮細胞が示す強さと同程度であった。

以上の超微形態的特徴は、ANIT による飼養を続けても変化はなく、むしろ小胆管上皮細胞としての特徴が、明瞭となってきた。

従って ANIT 投与により増生する oval cell はグリソン鞘の小胆管上皮細胞の性格をもつものであり、この細胞の肝細胞への分化は認められなかったのである。即ち光顕的および電顕的に DAB と ANIT において、ひとしく oval cell と呼ばれる増殖細胞でも、必ずしも総てが肝細胞へ分化するものでないことがわかった。

一方、同じ薬物を投与しても、その肝障害性が動物の種類により差があることが知られている。ANIT 投与によっても、ウサギでは肝障害がほとんど起こらないが、モルモットではラットに比して著しい肝細胞の巣状壊死が観察されている⁴⁹⁾。Batha⁵⁰⁾らもモルモットを使用して同様の所見を報告しているが、彼らは肝細胞障害性に加え、その初期より著しい小胆管上皮細胞の増生があると報告している。しかもこの増生してきた小胆管上皮細胞の中には肝細胞との移行型が多数観察されたとしている。このことはラット肝においてもモルモット肝と同様に強い肝細胞障害が加わることにより、移行型と呼ぶべき細胞が出現する可能性を示唆しているものと考えられ、今後に残された問題である。

(昭和 50. 4. 23 受理)

参 考 文 献

- Price, V. R., Harman, J. W., Miller, E. C. and Miller, J. A.: Progressive microscopic alterations on the liver of rats fed the hepatic carcinogens, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4'-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **12**, 192-200 (1952).
- Farber, E.: Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **16**, 142-148 (1956).
- Farber, E.: Ethionine carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **7**, 383-474 (1963).
- 妹尾左知丸: DAB 肝癌の発生様式の細胞酵素活性. 細胞化学シンポジウム **10**, 121-135 (1960).
- Leduc, E. H.: Cell modulation in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 253-255 (1959).
- Iwasaki, T., Dempo, K., Kaneko, A. and Onoé, T.: Fluctuation of various cell populations and their characteristics during azo-dye carcinogenesis. *Gann* **63**, 21-30 (1972).
- Inaoka, Y.: Significance of the so-called oval cell proliferation during azo-dye hepatocarcinogenesis. *Gann* **58**, 355-366 (1967).
- Onoé, T., Dempo, K., Kaneko, A. and Watabe, H.: Significance of α -fetoprotein appearance in the early stage of azo-dye carcinogenesis. *GANN Monograph on Cancer Research* **14**, 233-247 (1973).
- Grisham, J. W. and Hartroft, W. S.: Morphological identification by electron microscopy of "oval" cells in experimental hepatic degeneration. *Lab. Invest.* **10**, 317-332 (1961).
- Grisham, J. W. and Porta, E. A.: Origin and fate of proliferated ductal cells in the rat: Electron microscopic and autoradiographic studies. *Exptl. Mol. Pathol.* **3**, 242-261 (1964).
- Rubin, E., Hutterer, F., Danon, G. and Popper, H.: Deoxyribonucleic acid turnover in a heterogeneous population. Life-span of hepatic ductular cells. *Lab. Invest.* **12**, 657-662 (1963).
- Rubin, E.: The origin and fate of proliferated bile ductular cells. *Exptl. Mol. Path.* **3**, 279-286 (1964).
- Stewart, H. L. and Snell, K. C.: The histopathology of experimental tumors of the liver of the rat. A critical review of the histopathogenesis. In: F. Homburger (ed.), *Physiopathology of cancer*, pp. 85-126 New York, Harper and Row Publishers, Inc. (1959).
- Willson, J. W. and Leduc, E. H.: Role of cholangioles in restoration of the liver in the mouse after dietary injury. *J. Path. Bact.* **76**, 441-449 (1958).
- Stein, R. J., Kent, G. and Popper, H.: Effect of cortisone and growth hormone upon ductular cell proliferation in liver ethionine intoxication. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**, 24-28 (1958).
- Jaffe, E. R., Wissler, R. W. and Benditt, E. P.: The importance of methionine and choline in

- the arrest of dietary cirrhosis in the liver of the rat. *Am. J. Path.* **26**, 951-967 (1950).
- 17) Richardson, H. L. and Boros-Nachtnebel, E.: Study of liver tumor development and histologic changes on other organs in rats fed azo dye 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **11**, 398-403 (1951).
 - 18) Davidson, J.: The action of retrorsine on rat's liver. *J. Path. Bact.* **40**, 285-293 (1935).
 - 19) Orr, J.: The histology of the rat's liver during the course of carcinogenesis by butter yellow (p-dimethylaminoazobenzene). *J. Path. Bact.* **50**, 393-408 (1940).
 - 20) Wachstein, M. and Meisel, E.: On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 592 (1956).
 - 21) Ericsson, J. L. F.: On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 361-362 (1966).
 - 22) Leskes, A., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: Differentiation of endoplasmic reticulum in hepatocytes. 1. Glucose-6-phosphatase distribution in situ. *J. Cell Biol.* **49**, 264-287 (1971).
 - 23) Lopez, M. and Mazati, L.: Experimental investigations on alpha-naphthyl-iso-thiocyanate as a hyperplastic agent of the biliary ducts in the rat. *J. Path. Bact.* **69**, 243-250 (1955).
 - 24) Wisse, E.: An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* **31**, 125-150 (1970).
 - 25) Swanson, M. A.: Phosphatase of liver. 1. Glucose-6-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **184**, 647-659 (1950).
 - 26) Sabatini, D. D., Bensch, K. and Barnett, R. J.: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* **17**, 19-58 (1963).
 - 27) Goldfischer, S., Essner, E. and Novikoff, A. B.: The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 72-95 (1964).
 - 28) Ogawa, K., Minase, T. and Onoé, T.: Demonstration of glucose-6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.* **34**, 3379-3386 (1974).
 - 29) Chiquine, A. D.: Distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 429-435 (1953).
 - 30) Wisse, E.: Personal communication.
 - 31) Rosen, S. I.: The localization of glucose-6-phosphate hydrolysing enzyme in hepatocytes, red blood cells and leukocytes in liver of the newborn rat. *J. Anat.* **105**, 579-584 (1969).
 - 32) Schaffner, E. and Popper, H.: Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *Am. J. Path.* **38**, 393-410 (1961).
 - 33) 高橋五平: Azo 色素肝癌の発生過程における肝細胞微細構造の変化. III 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene 投与ラット肝の前癌期における変化. *札幌医誌* **23**, 1-19 (1963).
 - 34) Watabe, H.: Early appearance of embryonic α -globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **31**, 1192-1194 (1971).
 - 35) Kline, E. S. and Clayton, C. C.: Lactic dehydrogenase isozymes during development of azo dye tumors. *Proc. Soc. Biol. Med.* **117**, 891-894 (1964).
 - 36) Walker, P. R. and Potter, V. R.: Isozyme studies on adult, regenerating, precancerous and developing liver in relation to findings in hepatomas. *Adv. Enzyme Regulation* **10**, 339-364 (1972).
 - 37) Endo, H., Eguchi, M. and Yanagi, S.: Irreversible fixation of increased level of muscle type aldolase activity appearing in rat liver in the early stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **30**, 743-752 (1970).
 - 38) Kaneko, A., Dempo, K., Iwasaki, T. and Onoé, T.: Changes in the activity of glucose-6-phosphatase during azo-dye carcinogenesis. *Gann* **63**, 31-39 (1972).
 - 39) Kaneko, A., Dempo, K. and Onoé, T.: Changes in acid phosphatase during azo-dye carcinogenesis. *Gann* **63**, 41-48 (1972).
 - 40) Uriel, J., Aussel, C., Bouillon, D. and Nechaud, B. D.: Localization of rat liver α -fetoprotein by cell affinity labelling with tritiated oestrogens. *Nature New Biol.* **244**, 190-192 (1973).
 - 41) Onoé, T., Mori, M., Kaneko, A., Dempo, K. and Ogawa, K.: Significance of the appearance of α -fetoprotein in the early stage of azo-dye hepatocarcinogenesis. *Tumor Res.* **8**, 75-78 (1973).
 - 42) Dempo, K., Chisaka N., Yoshida, Y., Kaneko, A. and Onoé, T.: Immunofluorescent study on α -fetoprotein-producing cells in the early stage of

- 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res.* **35**, 1282-1287 (1975).
- 43) Steiner, J. W. and Carruthers, J. S.: Studies in the fine structure of the terminal branches of the biliary tree. 1. The morphology of normal bile canaliculi, bile pre-ductules (ducts of Hering) and bile ductules. *Am. J. Path.* **38**, 639-661 (1961).
- 44) Steiner, J. W. and Carruthers, J. W.: Studies on the fine structure of the terminal branches of the biliary tree. 2. Observations of pathologically altered bile canaliculi. *Am. J. Path.* **39**, 41-63 (1961).
- 45) Steiner, J. W. and Carruthers, J. S.: Experimental extrahepatic biliary obstruction. Some aspects of the fine structural changes of bile ductules and pre-ductules (ducts of Hering). *Am. J. Path.* **40**, 253-270 (1962).
- 46) Steiner, J. W. and Carruthers, J. S.: Electron microscopy of hyperplastic ductular cells in α -naphthyl isothiocyanate-induced cirrhosis. *Lab. Invest.* **12**, 471-498 (1963).
- 47) Steiner, J. W. and Baglio, C. M.: Electron microscopy of the cytoplasm of parenchymal liver cells in α -naphthyl isothiocyanate cirrhosis. *Lab. Invest.* **12**, 765-790 (1963).
- 48) Phillips, M. J. and Steiner, J. W.: Electron microscopy of cirrhotic nodules. Tubularization of the parenchyma by biliary cirrhosis. *Lab. Invest.* **15**, 801-817 (1966).
- 49) Phillips, M. J. and Steiner, J. W.: Comparative study of α -naphthyl isothiocyanate. *Lab. invest.* **20**, 480-487 (1969).
- 50) Bathal, P. S. and Christie, G. S.: A fluorescence microscopic study of bile duct proliferation induced in guinea pigs by α -naphthyl isothiocyanate. *Lab. Invest.* **20**, 480-487 (1969).
- 51) Chou, S. T. and Gibson, J. B.: A comparative histochemical study of rat livers in alpha-naphthyl-iso-thiocyanate (ANIT) and dl-ethionine intoxication. *J. Path.* **108**, 73-83 (1972).

附 図 説 明

- 第 1 図 正常ラット肝組織: G-6-Pase 活性は肝小葉全体にほぼ均等に強く認める。(G-6-Pase 染色) ($\times 100$)
- 第 2 図 正常ラット肝組織: 肝細胞の細胞質にのみ G-6-Pase 活性を認め、沿岸細胞、小胆管上皮細胞には活性を認めない。(G-6-Pase 染色) ($\times 500$)
- 第 3 図 正常ラット肝組織: G-6-Pase 活性は核膜周囲腔 (PNC), 粗面小胞体 (RER) 滑面小胞体 (SER) にのみ認め、他は陰性である。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色) ($\times 12,000$)
- 第 4 図 正常ラット肝組織: 短時間固定後 G-6-Pase 活性を検索, 第 3 図同様, 肝細胞にのみ活性があり小胆管上皮細胞 (矢印) は、この拡大では陰性にみえる。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色) ($\times 1,8000$)
- 第 5 図 第 4 図の拡大: 小胆管上皮に極く弱い活性 (矢印) をみる。(G-6-Pase 染色) ($\times 10,000$)
- 第 6 図 DAB 投与 2 週目ラット肝: 小葉周辺部に oval cell の増生をみる。(HE 染色) ($\times 270$)
- 第 7 図 DAB 投与 4 週目ラット肝: oval cell の増生が中間帯にまで及び、この中には核が円形で、比較的細胞質の豊かな肝細胞に似た細胞が混入している。(HE 染色) ($\times 270$)
- 第 8 図 DAB 投与 6 週目ラット肝: 前記の肝細胞に似た小型の細胞増生が著明である。(HE 染色) ($\times 270$)
- 第 9 図 DAB 投与 4 週目ラット肝: 小型の肝細胞に似た細胞も PTAH で染色される。(PTAH 染色) ($\times 270$)
- 第 10 図 DAB 投与 4 週目ラット肝: oval cell の増生部に一致して G-6-Pase 活性は陰性であるが、この部にも陽性細胞が混入している。(G-6-Pase 染色) ($\times 100$)
- 第 11 図 DAB 投与 6 週目ラット肝: 小型の肝細胞集団にも G-6-Pase 活性をみる。(G-6-Pase 染色) ($\times 270$)
- 第 12 図 ANIT 投与ラット肝 2 週目: DAB と同様に oval cell の増生を小葉周辺部にみる。(HE 染色) ($\times 270$)

- 第13図 ANIT 投与ラット肝4週目: 増生細胞は拡張した腺腔を形成している。(HE 染色)(×270)
- 第14図 ANIT 投与ラット肝5週目: 腺腔周囲は結合織の強い増生をみる。(HE 染色)(×100)
- 第15図 ANIT 投与ラット肝4週目: 増生してきた細胞はPTAHで染色されない。(PTAH 染色)(×270)
- 第16図 ANIT 投与ラット肝4週目: G-6-Pase 活性は増生細胞に認めない。(G-6-Pase 染色)(×100)
- 第17図 ANIT 投与ラット肝6週目: DAB でみたような小型の肝細胞は出現せず, 増生細胞には活性を認めない。(G-6-Pase 染色)(×270)
- 第18図 DAB 投与2週目ラット肝: グリソン鞘の小胆管上皮細胞に連続して oval cell (Oc) が小葉内に増生している。肝細胞(H)と共通の管腔(Hering 管)をつくっている部もみえる。G-6-Pase 活性は oval cell には認めない。(G-6-Pase 染色, 鉛, ウラニル重染色)(×1,000)
- 第19図 同上: 肝細胞(H)と接している oval cell (Oc) に極く弱い活性をみる。(G-6-Pase 染色, 鉛, ウラニル重染色)(×2,600)
- 第20図 DAB 投与4週目ラット肝: 種々の形態および G-6-Pase 活性を示す oval cell がみえる。とり残された肝細胞(矢印)もみえる。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×1,000)
- 第21図 同上: 小胆管上皮細胞に類似する oval cell (Oc) で, G-6-Pase 活性は認めない。肝細胞(H)。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×2,000)
- 第22図 同上: 小胆管上皮細胞と肝細胞の両方の特徴を示す細胞。核は円形化し, 糸粒体もやや大型であり, ER も比較的発達している。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×10,000)
- 第23図 同上: 前者よりもより肝細胞に近い oval cell。基底膜(矢印)も断片的に存在する。マイクロボディはみえない。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×10,000)
- 第24図 同上: 種々の形態を示す oval cell。マイクロボディ(矢印)を持つ細胞もある。小胆管上皮細胞に類似の oval cell (Oc1, Oc1') 肝細胞に近い oval cell (Oc3), その中間的細胞 (Oc2)。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×5,000)
- 第25図 DAB 投与6週目ラット肝: 小胆管上皮細胞に似た oval cell が小葉周辺部にみえる。小型であるが肝細胞の特徴を持った細胞が増生している。(鉛, ウラニル重染色)(×1,200)
- 第26図 ANIT 投与2週目ラット肝: グリソン鞘の小胆管上皮細胞の増生が著明で, 核分裂(Mt)像もみえる。肝細胞の変化は乏しい。(鉛, ウラニル重染色)(×1,200)
- 第27図 ANIT 投与2週目ラット肝: 増生している細胞は小胆管上皮細胞と連続しており, Hering 管を形成している細胞も認める。G-6-Pase 活性は陰性である。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×1,200)
- 第28図 同上: Hering 管(矢印↑)を形成している細胞に極く弱い G-6-Pase 活性をみる。矢印↑は基底膜 (G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×6,6000)
- 第29図 ANIT 投与ラット肝4週目: 管腔形成が著明である。G-6-Pase 活性は陰性である。(G-6-Pase 染色, 鉛単染色)(×1,200)



















